

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Martina Dobšová

Epigenetická regulace retrovirů
Epigenetic regulation of retroviruses

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Kateřina Trejbalová, PhD.

Praha, 2012

Poděkování:

Děkuji Mgr. Kateřině Trejbalové, PhD. za cenné rady a připomínky při vypracovávání této bakalářské práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.05.2012

.....

1. Abstrakt

Retrovirus HIV-1 se během svého životního cyklu integruje do hostitelského genomu, ERVWE1 (syncytin-1) je v lidském genomu přítomen stabilně. Jako součást genomu podléhá epigenetickým regulacím jako jsou methylace DNA a acetylce a methylace histonů. U HIV-1 je deacetylce histonů a hypermethylace DNA v promotorových oblastech spojena s ustavením latentního stavu viru. Latentní rezervoár HIV-1 v paměťových $CD4^+$ T-buňkách je zásadním problémem při antiretrovirové terapii (HAART), protože tento rezervoár zůstává léčbou nedotčen. V případě syncytinu-1 vede hypermethylace DNA v promotorové oblasti k jeho transkripčnímu umlčení. To je důležité při tkáňově specifické regulaci, protože za fyziologických podmínek dochází k expresi syncytinu-1 pouze v placentě, kde je výrazně snižená methylace DNA v promotorové oblasti. V dalších tkáních, jako je tkáň varlat, je zvýšená exprese syncytinu-1 spojena s nádory buněk germinální linie a s hypomethylací jeho promotoru. Epigenetická regulace retrovirů pomocí methylace DNA a chromatinových modifikací se výrazně podílí na regulaci exprese těchto retrovirů. Součástí bakalářské práce je i praktická část, která se zabývá klonováním kódující sekvence syncytinu-1 do expresního plasmidu, následnou transfekcí do buněčné linie HCT 1-3B⁺ a měřením hladiny exprese v porovnání s netransfekovanými buňkami.

Klíčová slova: retroviry, endogenní retroviry, DNA methylace, histonové modifikace, retrovirová transkripce

Abstract

The human genome is the site of integration of the retrovirus HIV-1, ERVWE1 (syncytin-1) is its stable part. Thus as an integral part of the genome, they are under influence of important genome based epigenetics regulations, such as DNA methylation, histone methylation and acetylation. Promoter DNA hypermethylation and histone deacetylation leads to establishment and maintenance of latent state of the HIV-1 virus and formation of the latent reservoir in the CD4⁺ memory T-cells. This process leads to severe problems during HIV-1 infection treatment by antiretroviral therapy (HAART), as the HIV-1 latent reservoir remains unaffected. Moreover DNA hypermethylation in the promoter of syncytin-1 directs its transcriptional silencing, which is important in tissue specific regulation of this fusogenic protein. In physiological conditions syncytin-1 expression is observed only in placental cells, where the DNA methylation of promoter is decreased. Higher expression level of syncytin-1 was also observed in several other tissues, such as testes, where it is tightly coupled with germ-cells tumors and syncytin-1 promoter hypomethylation. In conclusion, epigenetic regulation of retroviruses by DNA methylation and chromatin modifications highly influence regulation of their expression. Presented bachelor thesis also shows in its practical part a construction of the syncytin-1 expression plasmid, its transfection into HCT 13B⁺ cell line and detection of syncytin-1 expression level in those cells.

Key words: retroviruses, endogenous retroviruses, DNA methylation, histone modifications, retroviral transcription

2. Obsah

1. Abstrakt.....	3
2. Obsah.....	5
3. Seznam zkratk.....	6
4. Úvod.....	9
5. Teoretická část.....	10
5.1 Epigenetická regulace: methylace DNA a chromatinové modifikace.....	10
5.2 Retroviry.....	12
5.3 Exogenní retroviry.....	14
5.3.1 Úvod.....	14
5.3.2 HIV-1.....	15
5.3.2.1 Infekce virem HIV-1.....	15
5.3.2.2 Léčba infekce virem HIV-1.....	16
5.3.2.3 Latentní stav HIV-1.....	16
5.3.2.4 Latentní stav, transkripční faktory a místo integrace.....	17
5.3.2.5 Epigenetická regulace HIV-1.....	18
5.3.2.6 Methylace HIV-1.....	19
5.4 Endogenní retroviry	20
5.4.1 Úvod.....	20
5.4.2 Syncytin-1.....	21
5.4.2.1 Charakteristika.....	21
5.4.2.1.1 Vlastnosti.....	21
5.4.2.1.2 Transkripce syncytinu-1.....	22
5.4.2.1.3 Exprese syncytinu-1.....	23
5.4.2.2 Exprese endogenních retrovirů v placentě a jejich regulace.....	24
5.4.2.3 Methylace syncytinu-1.....	24
5.4.2.3.1 Stupeň methylace v různých tkáních.....	24
5.4.2.3.2 Stupeň methylace v buňkách placenty	25
5.4.2.3.3 Změna stupně methylace promotoru syncytinu-1 v patologických procesech.....	26
5.4.3 Syncytin-2.....	27
6. Praktická část.....	27
6.1 Cíl práce.....	27
6.2 Materiály a metody.....	27
6.3 Výsledky.....	32
6.4 Diskuze.....	34
7. Závěr	35
8. Použitá literatura.....	36

3. Seznam zkratek

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	syndrom získaného selhání imunity
ALV	Avian Leukosis Virus	virus ptačí leukózy
ASCT2	neutral amino acid transporter 2	přenašeč neutrálních aminokyselin 2
BIV	Bovine Immunodeficiency Virus	virus imunodeficiency hovězího dobytka
CAEV	Caprine Arthritis-encephalis Virus	virus artritidy a encephalitidy koz
cAMP	cyclic adenosin monophosphate	cyklický adenosin monofosfát
CAP	adenylate cyclase associated protein	protein asociovaný s adenylát cyklasou
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CD4	cluster of differentiation 4	klastr diferenciacie 4
CCR5	C-C chemokine receptor type 5	C-C chemokinový receptor typu 5
CMV	cytomegalovirus	cytomegalovirus
Cq	quantification cycle	cyklus kvantifikace
CS	calf serum	sérum z dospělého dobytka
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4	C-X-C chemokinový receptor typu 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Eaglovo médium modifikované Dulbeccem
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
DNMT1	DNA methyltransferase 1	DNA methyltransferasa 1
DNMT3a	DNA methyltransferase 3a	DNA methyltransferasa 3a
DNMT3b	DNA methyltransferase 3b	DNA methyltransferasa 3b
DNMT3L	DNA methyltransferase 3-like protein	protein podobný DNA methyltransferase 3
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphates	deoxyribonukleotid trifosfáty
EAIV	Equine Infectious Anemia Virus	virus koňské infekční anémie
env	envelope glycoprotein	obalový glykoprotein
ERV	endogenous retrovirus	endogenní retrovirus
ERV3	Endogenous Retrovirus 3	endogenní retrovirus 3
ERVFRDE1	lokus coding env glycoprotein, chromosome 6q24.1, family FRD, member 1	lokus kódující env glykoprotein, chromosom 6q24.1, rodina FRD, člen 1

ERVWE1	lokus coding env glycoprotein, chromosome 7q21-22, family W, member 1	lokus kóující env glykoprotein, chromosom 7q21-22, rodina W, člen 1
FCS	fetal calf serum	fetální sérum z dobytka
FeLV	Feline Leukemia Virus	virus kočičí leukémie
FIV	Feline Immunodeficiency Virus	virus kočičí imunodeficiency
FW primer	forward primer	dopředu směřující primer
gag	group specific antigen	skupinově specifický antigen
GCM1	glial cell missing mammalian homolog 1	savčí homolog, v jehož nepřítomnosti chybí gliové buňky 1
gp120	envelope glycoprotein 120	obalový glykoprotein 120
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy	vysoce aktivní antiretrovirová terapie
HAT	histone acetyltransferase	histonová acetyltransferasa
HDAC-1	histone deacetyltransferase 1	histonová deacetyltransferasa 1
HERV	human endogenous retrovirus	lidský endogenní retrovirus
HERV-K	Human Endogenous Retrovirus – K	lidský endogenní retrovirus – K
HERV-P	Human Endogenous Retrovirus – P	lidský endogenní retrovirus – P
HERV-W	Human Endogenous Retrovirus – W	lidský endogenní retrovirus – W
HHV-8	Human Herpesvirus 8	lidský herpesvirus 8
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1	lidský virus imunodeficiency 1
HIV-2	Human Immunodeficiency Virus 2	lidský virus imunodeficiency 2
HTLV-III	Human T Lymphotropic Virus type III	lidský T-lymfotropní virus typu III
HMT	histon methyltransferase	histonová methyltransferasa
HP1γ	heterochromatin protein 1 γ	heterochromatinový protein 1 γ
H3	histone 3	histon 3
H3K9	lysine 9 of histone 3	lysin 9 histonu 3
H3K4	lysine 4 of histone 3	lysin 9 histonu 4
KAP1	KRAB-ZFP-associated protein 1	protein asociovaný s KRAB-ZTF 1
LAV	Lymphadenopathy Associated Virus	virus asociovaný s lymfadenopatií
LB medium	lysogeny broth medium	médium obsahující bujónový lyzát
LTR	long terminal repeat	dlouhá koncová repetice
MBD	methyl-CpG-binding domain	protein s methyl CpG vazebnou

	protein	doménou
MCF	Human Breast Adenocarcinoma Cells	buňky lidského adenokarcinomu prsu
MeCP2	methyl CpG binding protein 2	methyl CpG vazebný protein typu 2
MLV	Murine Leukemia Virus	virus myši leukémie
MSFD2	major facilitator superfamily domain containing 2	
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
NFAT	nuclear factor of activated T-cells	jaderný faktor aktivovaných T-buněk
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	jaderný faktor podporující lehký řetězec κ aktivovaných B-buněk
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	periferní krevní jednojaderné buňky
PBS	primer binding site	vazebné místo pro primer
PCR	polymerase chain reaction	polymerasová řetězová reakce
pol	polymerase	polymerasa
PPT	polypurine tract	polypurinové místo
p50	protein 50, part of NF-κB	protein 50, součást NF-κB
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RPII	RNA polymerase II	RNA polymerasa II
RT-PCR	reverse transcription PCR	PCR po reverzní transkripci
RV primer	reverse primer	opačně jdoucí primer
SIV	Simian Immunodeficiency Virus	virus imunodeficiency opic
Sp1	specificity protein 1	specifický protein 1
SU	surface subunit	povrchová podjednotka env protein
TM	transmembrane subunit	transmembránová podjednotka
TNF-α	tumor necrosis factor α	faktor nádorové nekrózy α
TSE	trophoblast specific enhancer	enhancer specifický pro trofoblasty
T₁₀E₀₁	1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 ml EDTA (0.5 M)	1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 ml EDTA (0.5 M)
U	unit	jednotka
wt	wild-type	gen s nezměněnou alelou
ZFP57	zinc finger protein 57	protein tvořený zinkovými prsty 57

4. Úvod

Díky specifickému replikačnímu cyklu tvoří retroviry samostatnou skupinu virů. Enzym reverzní transkriptasa umožňuje přepis RNA do DNA. Objev reverzní transkriptasy nejen že vyčlenil novou skupinu, ale také přispěl k rozvoji laboratorních metod. Reverzní transkriptasa je nedílnou součástí protokolů na přípravu například cDNA z RNA. Na poli retrovirologie bylo uděleno několik Nobelových cen, například za objev reverzní transkriptasy, David Baltimore, Howard Temin a Renato Dulbecco, 1975.

Pro retroviry je charakteristická schopnost se integrovat do genomu svého hostitele. Jako součást hostitelské DNA pak podléhají integrované proviry epigenetickým modifikacím. Z těch jsou nejdůležitější acetylace a methylace histonů a methylace DNA v promotorových oblastech. Acetylace a methylace histonů a methylace DNA se účastní regulace transkripce. Jsou součástí mechanismů určujících, jestli bude docházet k expresi virových proteinů a genomů.

Tato bakalářská práce pojednává o epigenetické regulaci lidských retrovirů. Vzhledem ke komplexnosti tématu retrovirů je zaměřena zejména na regulační mechanismy, expresi v jednotlivých typech tkání a na dopady na lidský organismus. Úvod týkající se retrovirů proto neobsahuje všechny poznatky z pole retrovirologie, ale je spíše věnován nejdůležitějším vlastnostem této skupiny a těm poznatkům, které jsou důležité z hlediska tématu této bakalářské práce. Jako zástupci lidských retrovirů byli vybráni syncytin-1 za endogenní retroviry a HIV-1 za exogenní retroviry.

Součástí práce je i praktická část, která obsahuje postup pro klonování kódující sekvence syncytinu-1 do expresního plasmidu, transfekce do buněčné linie HCT 1-3B a změření hladiny exprese syncytinu-1 v těchto buňkách pomocí kvantitativní RT-PCR.

5. Teoretická část

5.1 Epigenetická regulace: methylace DNA a chromatinové modifikace

Principem epigenetických regulací je změna funkce genů, která je dědičná, ale nemění sekvenci DNA. Mezi epigenetické modifikace patří posttranslační histonové modifikace a methylace DNA.

Základní jednotkou uspořádání DNA je nukleosom tvořený 146 bp dlouhým úsekem DNA, který se obtáčí kolem oktameru histonů. Histonový oktamer je složen z dimerů histonů H2A, H2B, H3 a H4. Dohromady vytvářejí dvě domény. Z nukleosomů trčí N-konce histonových proteinů, které mohou být posttranslačně modifikovány. Mezi tyto modifikace patří acetylce, methylace, fosforylace, ubiquitinace a sumoylace.

Methylaci specifických histonů uskutečňují histonové methyltransferasy, HMT. Donorem methylové skupiny je obvykle S-adenosyl-L-methionin. Častou methylací je methylace histonu H3 na lysinu 9, H3K9, nebo H3 na lysinu 4, H3K4. Při těchto methylacích může být na jeden lysin připojena jedna, dvě či tři methylové skupiny. Vzniká tedy například H3K9me1, H3K9me2 nebo H3K9me3. Acetylce histonů je zprostředkována histonovými acetyltransferasami, HAT. Existují samozřejmě i enzymy provádějící opačné procesy, tedy deacetylaci a demethylaci histonů.

Histonové posttranslační modifikace regulují nasedání vazebných proteinů na DNA a tím se podílejí na regulaci exprese. Pro regulaci transkripce jsou nejdůležitější histonové modifikace promotorových oblastí. Důležitými modifikacemi jsou například methylace H3K4, která má aktivační účinek, nebo methylace H3K9, která má účinek inhibiční. Transkripčně aktivní euchromatin je spojen s hyperacetylací histonů zatímco transkripčně inaktivní heterochromatin s jejich hypoacetylací (Grunstein, 1997). Acetylce a deacetylce histonů mění strukturu nukleosomů. Deacetylce ϵ -aminoskupin lysinu umožňuje iontovou interakci pozitivně nabitých aminoskupin čnicích z nukleosomů se záporně nabitou fosfátovou kostrou DNA. To vede k tomu, že se chromatin stane kompaktnějším (Bestor, 1998) a bude docházet k potlačení exprese v dané oblasti.

K methylaci DNA dochází připojením methylové skupiny na pozici 5 cytosinu v CpG dinukleotidu, čímž vzniká 5-methylcytosin. Methylace je zprostředkována DNA 5-cytosin methyltransferasami: DNMT1, DNMT3a a DNMT3b.

Methyltransferasa DNMT1 slouží k udržování methylačních vzorců během

replikace (Leonhardt et al., 1992) a má preferenční aktivitu k hemimethylovanému substrátu. Z experimentů Gaudeta a kolegů vyplynulo, že methyltransferasa DNMT1 není důležitá jen pro vytvoření udržovací methylace během embryogeneze, ale její přítomnost je nutná i pro udržení methylace daných genů během dalšího vývoje. Pokusy prováděné na myších odhalily, že snížení množství methyltransferasy DNMT1 vede k aktivaci některých genů během embryogeneze (Gaudet et al., 2004).

Methyltransferasy DNMT3a a DNMT3b provádějí methylaci *de novo* (Okano et al., 1999). *De novo* methylace hraje velmi důležitou roli v embryogenezi a ve vývoji primordiálních germinálních buněk, protože po oplození dochází ke zničení methylačních značek a ty musí být poté obnoveny. Důležitá je zde role proteinu DNMT3L, který sám sice methyltransferasovou aktivitu nemá, ale stimuluje methyltransferasy DNMT3a a DNMT3b (Chedin et al., 2002; Suetake et al., 2004).

Methyltransferasa DNMT3a představuje i spojení mezi methylací DNA a histonovými modifikacemi, konkrétně methylací histonů. Methyltransferasa se je schopna přes protein DNMT3L vázat na nemethylovaný H3K9 a tam zprostředkovává *de novo* methylaci DNA (Jia et al., 2007). Existují i další proteiny, které se účastní vazby na DNA a methyltransferasy a tak zprostředkovávají methylaci dané oblasti. Například protein ZFP57, jehož součástí je KRAB doména, se váže na DNA a přes protein KAP1 na methyltransferasu DNMT1 (Zuo et al., 2012).

Pokud je CpG methylace v promotorové oblasti, má vliv na transkripci daného genu. Methylace zabraňuje přepisu genů tím, že svou přítomností blokuje vazebná místa pro transkripční faktory (Iguchi-Arigo and Schaffner, 1989) nebo jí zabraňuje nepřímo pomocí specifických CpG vazebných proteinů (Hendrich and Bird, 1998).

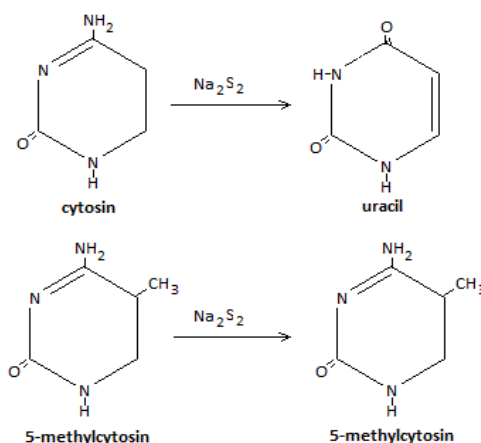
Na methylované CpG dinukleotidy se jsou schopny vázat proteiny s methyl-CpG-vazebnou doménou, MBP, které tak zprostředkovávají represi transkripce (Hendrich and Bird, 1998). U savců je charakterizováno šest rodin těchto proteinů: MBD1-MDB4 (Hendrich and Bird, 1998), MeCP2 (Nan et al., 1996) a Kaiso (Prokhortchouk et al., 2001). Z experimentů Nana a jeho kolegů vyplynulo, že MeCP2 navázaný na methylových skupinách na DNA přitahuje komplex proteinu mSin3 s HDAC, tento komplex remodeluje chromatin a ten se stává transkripčně inaktivním (Nan et al., 1998). Histonové deacetylasy jsou naváděny specifickými doménami do míst genomu, která obsahují určitý methylační vzorec (Bestor, 1998).

Prozatím není jasné, jestli jako první dochází k methylaci DNA a následně k histonovým modifikacím nebo naopak. Různé autoři prezentují odlišné výsledky.

Metodou sloužící ke zjišťování stupně methylace DNA je bisulfitové

sekvenování. Jako první použili tuto metodu Marianne Frommerová a její kolegové (Frommer et al., 1992). Zkoumaná DNA je vystavena působení bisulfitu sodného, po kterém dochází k přeměně cytosinových zbytků na uracily (obr.1), kdežto 5-methylcytosiny zůstávají nezměněny. Sekvence zájmu je pak amplifikována pomocí specifických primerů PCR metodou. Vzniklé PCR produkty jsou osekvenovány a ze získaných sekvencí zjištěna methylace.

Při epigenetické regulaci dochází ke změně chromatinové struktury, která je spojena s methylací/demethylací DNA.



Obr. 1: Schéma znázorňující princip bisulfitového sekvenování. Cytosiny se vlivem působení bisulfitu sodného, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, přemění na uracil, ale 5-methylcytosiny se nijak nezmění.

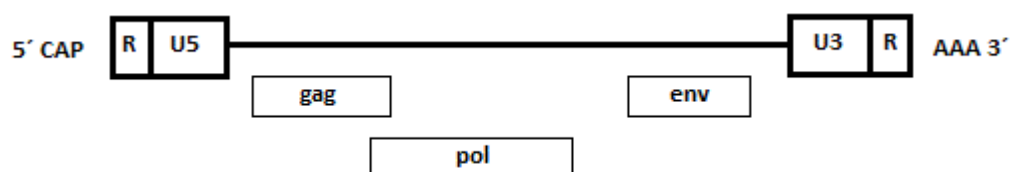
5.2 Retroviry

Díky svému opravdu specifickému životnímu cyklu tvoří retroviry mezi viry samostatnou skupinu. Pro retroviry je charakteristický enzym reverzní transkriptasa, který přepisuje sekvenci z RNA do DNA (Baltimore, 1970). Tento objev změnil tehdy platné schéma toku genetické informace a obohatil jej o nový proces.

Genom retrovirů je tvořen dvěma kopiemi +RNA. První zmínku o tom, že by mohla být genomová RNA retrovirů tvořena dvěma kopiemi pochází od Bellamyho a jeho kolegů (Bellamy et al., 1974). Genom obsahující dvě kopie +RNA bývá označován také jako tzv. pseudouniploidní genom. Oba řetězce +RNA váží na PBS, primer vazebné místo, specifické buněčné tRNA. Ty slouží jako primer pro reverzní transkriptasu (Barat et al., 1989). Genomová RNA je sdružena s nukleoproteinem.

Genomová nukleová kyselina se u retrovirů skládá z 5' oblasti, která je tvořena úseky R a U5, a 3' oblasti tvořenou úseky U3 a R. Mezi nimi jsou geny kódující proteiny Gag, Pol, Env a případně další pomocné proteiny. Ty se u jednotlivých

retrovirů liší. Znázorněno na obr. 2. Genomová +RNA má formu hostitelské mRNA, tedy na 5' konci má 5-methylguanositovou čepičku a na 3' konci polyA sekvenci. Další součástí genomu je již zmíněná PBS sekvence, dále Ψ sekvence sloužící jako enkapsidační signál a PPT neboli polypurinová oblast, která funguje jako primer při syntéze + řetězce provirové DNA. *Pol* gen kóduje tři enzymy a to reverzní transkriptasu, integrasu a proteasu, *env* gen kóduje obalový protein a *gag* gen antigen specifický pro danou skupinu.



Obr. 2: Struktura retrovirového genomu. 5' oblast se skládá z úseku R a U5, 3' z U3 a R. Mezi nimi leží geny kódující hlavní proteiny Gag, Pol a Env. Geny pro Gag a Pol protein se částečně překrývají.

Po reverzní transkripci se na 3' i 5' konci vytvoří LTR oblasti. Každé LTR se vždy skládá ze tří částí a to U3, R a U5. Oblast R je krátkou přímou terminální repeticí, U3 i U5 jsou unikátní sekvence, které se uplatňují zejména v regulaci exprese, při enkapsidaci genomu a při reverzní transkripci. 5' LTR slouží jako promotorová oblast, 3' LTR ukončuje transkripci. Obě LTR však obsahují stejné úseky, tedy 5' oblast v sobě má R, které má polyadenylační signál a 3' oblast obsahuje U3, což je promotorová oblast.

Retroviry obecně vstupují do buněk pomocí receptorem zprostředkované endocytosy, případně přímo přes membránu, kdy se stanou součástí endosomu. Následně dojde k vyklopení obsahu kapsidy do cytoplasmy buňky, čímž se uvolní jednotlivé komponenty.

Reverzní transkripce, tedy přepis retrovirového genomu z RNA do DNA pomocí enzymu reverzní transkriptasy, začíná již v kapsidě, protože enzym reverzní transkriptasa je ve virionu přítomen a také se zde nacházejí volné deoxynukleosidtrifosfáty, dNTP. Přepis genomu je dokončen až v hostitelské buňce.

Retrovirový genom se musí z cytoplasmy hostitelské buňky dostat do jádra. Některé z retrovirů jsou toho schopny pouze když chybí jaderná membrána, tedy jediné při dělení buňky. Takovýmto retrovirem je například virus způsobující leukémii u myši,

MLV. Jiné retroviry, jako je například HIV-1, jsou schopny se do jádra dostat i přes jadernou membránu během interfáze.

Pro retroviry je charakteristická integrace do genomu hostitele. Integrace je realizována pomocí enzymu DNA integrasy. Tento enzym je dostačující pro průběh celého integračního procesu (Craigie et al., 1990). Do hostitelského genomu je integrována DNA retroviru. Ta je po integraci označována jako provirová DNA. Poté, co se stane součástí genomu, je normálně přepisována buněčným aparátem spolu s geny hostitele. Pomocí hostitelské RNA polymerasy II vznikají retrovirové RNA, některé jsou následně sestřiženy a z nich jsou translatovány retrovirové proteiny. Proteiny Gag a Pol vznikají ve formě polyproteinu, který je retrovirovou proteasou rozštěpen na samostatné proteiny. Ve chvíli, kdy se vytvoří všechny potřebné proteiny a neseštrížené genomové nukleové kyseliny, dojde k vytvoření virových částic a ty opouštějí hostitelskou buňku pučením. Morfogenese kapsid může probíhat buď v cytoplasmě buněk, v endoplazmatickém retikulu, nebo při pučení na cytoplasmatické membráně hostitelské buňky.

Retrovirové viriony mají ikosahedrální tvar a na povrchu lipidový obal, jedná se tedy o viry obalené. Uvnitř kapsidy je uložena genomová nukleová kyselina, nukleoprotein, reverzní transkriptasa, proteasa a integrasa. Dále je zde přítomen matrixový protein, který je součástí nukleokapsidy. Z lipidového obalu vyčnívají Env transmembránové proteiny, jsou často glykosylované a zajišťují kontakt s receptorovými proteiny hostitele.

Retroviry můžeme dělit na endogenní a exogenní. U exogenních retrovirů se vytvářejí infekční viriony, které mohou infikovat další jedince stejné generace různými formami přenosu (viz kapitola 5.3). Pokud se exogenní retrovirus integruje do buněk germinální linie, stává se z něj virus endogenní (viz kapitola 5.4).

Mezi lidské exogenní retroviry patří HIV-1, dalšími retroviry napadajícími primáty jsou SIV, který infikuje například šimpanze a mandrily, a HIV-2. Dále mezi exogenní retroviry patří virus EAIV infikující koně, CAEV napadající kozy, BIV napadající hovězí dobytek, FIV virus infikující kočkovité šelmy a ALV infikující ptáky. Mezi lidské endogenní retroviry patří syncytin-1 a 2.

5.3 Exogenní retroviry

5.3.1 Úvod

Pro exogenní retroviry je charakteristické, že se během svého životního cyklu vyskytují jak ve stádiu virionu, tak i jako integrovaný provirus uvnitř genomu

hostitelského organismu. Při infekci virus vstoupí do buňky hostitele, přesune se do jejího jádra, integruje se do genomu a postupně zvyšuje množství svých kopií, tedy virionů i integrovaných provirů. Nově vytvořené viriony mohou infikovat další buňky či další jedince. K přenosu z jednoho jedince na druhého dochází horizontálně. Tím se zásadně liší od retrovirů endogenních, které jsou stabilně integrovány do hostitelského genomu zárodečných buněk a dochází u nich k vertikálnímu přenosu mezi jedinci.

5.3.2 HIV-1

HIV-1 neboli lidský virus imunodeficiency-1 patří mezi exogenní retroviry infikující člověka. Dříve býval také označován jako virus LAV, virus spojený s lymfadenopatií, či HLTV-III, lidský T-lymfotropní virus typu III. Jak už z názvu vyplývá, napadá buňky imunitního systému, oslabuje imunitní systém a u nakaženého jedince je tak vyšší riziko propuknutí různých infekcí, z nichž některé mohou být letální.

Struktura HIV-1 proviru odpovídá klasickému retrovirovému uspořádání. Na koncích jsou LTR sekvence tvořené U3, R a U5 a mezi nimi leží geny *gag*, *pol* a *env*. Genom HIV-1 navíc ještě nese geny pro přídavné proteiny.

Přichycení a vstup HIV-1 do buňky je zprostředkován interakcí mezi virovými proteiny a buněčnými receptory. V případě HIV-1 dochází k interakci mezi virovým proteinem Env a receptorem CD4 buněk, kam HIV-1 vstupuje. Pro infekci a vstup je potřeba ještě přítomnost buněčných koreceptorů. Koreceptory vstupu HIV-1 do buňky jsou CXCR4 (α -chemokinový receptor) a CCR5 (β -chemokinový receptor). S těmito koreceptory interaguje virový protein gp120 (Feng et al., 1996; Choe et al., 1996).

Kromě HIV-1 existuje i retrovirus HIV-2. Tyto retroviry se liší svým genomem, protože mají odlišný původ. Oba u nakažených jedinců sice způsobují AIDS, ale v případě HIV-2 je mnohem delší inkubační doba (Marlink et al., 1994).

5.3.2.1 Infekce virem HIV-1

Onemocnění vznikající po infekci HIV-1 virem se nazývá AIDS, syndrom získané imunodeficiency. Po proniknutí viru do buněk dochází k integraci HIV-1 proviru do DNA hostitele. V případě produktivní infekce jsou viriony přítomny v krvi a postupně dochází k úbytku CD4⁺ T-buněk. V pozdějších fázích se začínají vyskytovat oportunní infekce a klinické symptomy s nimi spojené. Častými onemocněními jsou

infekce způsobené herpes viry, tuberkulóza, Kaposiho sarkom asociovaný s herpesvirem HHV-8 či nákaza kvasinkami, zejména rodu *Candida*.

K přenosu viru HIV-1 z člověka na člověka může dojít sexuálním kontaktem, injekčními jehlami, transfuzemi krve či přenosem z matky na plod.

5.3.2.2 Léčba infekce virem HIV-1

Po infekci virem HIV-1 dochází k poklesu počtu CD4⁺ T-lymfocytů, protože jsou virem infikovány a umírají. Jako počátek onemocnění AIDS se bere pokles jejich počtu pod 350 v mm³ krve. Díky highly active anti-retroviral therapy (HAART) velmi klesla úmrtnost, léčba také vede ke zmírnění průběhu nemoci (Palella et al., 1998). HAART je soubor obvykle tří či čtyř různých inhibitorů retrovirového replikačního cyklu. Tato léčba je velmi účinná proti viru obsaženému v krvi, kde dochází ke značnému snížení jeho množství (Hammer et al., 1997).

5.3.2.3 Latentní stav HIV-1

Pro HIV-1 je charakteristické, že po integraci do genomu hostitele přetrvává provirus v některých CD4⁺ T-lymfocytech v latentním stavu a to i po HAART léčbě (Chun et al., 1997). Tento latentní virový rezervoár přítomný především v paměťových CD4⁺ T-buňkách se v nich vytvořil před terapií a zůstává léčbou nedotčen (Chun et al., 1997). Bylo zjištěno, že latentní proviry přítomné v CD4⁺ T-lymfocytech mohou být *in vivo* naindukovány a začnou vznikat replikačně kompetentní viry (Chun et al., 1997). Z latentně infikovaných paměťových CD4⁺ T-lymfocytů pacienta na HAART léčbě lze po jejich aktivaci získat replikačně kompetentní virus (Wong et al., 1997). Transkripce HIV-1 byla nalezena i v PCBM pacientů na HAART léčbě (Furtado et al., 1999). HAART léčba nezničí v pacientovi všechny replikačně kompetentní viry a proto nelze léčbu přerušit. Ke vzniku infekčních virionů z latentního rezervoáru může dojít i pokud se aktivuje imunitní systém pacienta. Při aktivaci imunitního systému se aktivují paměťové CD4⁺ T-lymfocyty, které mohou obsahovat latentní proviry. Nevýhodou HAART léčby jsou i problémy plynoucí z dlouhodobého užívání – toxicita a finanční náročnost.

Zničení latentního virového rezervoáru je v poslední době předmětem výzkumu. Přesto stále nebyl objeven způsob, jakým by se dalo zabránit virové replikaci úplně a trvale. Například Levin a kolegové publikovali studii, ve které stimulace buněk obsahujících latentní proviry pomocí stimulatorů INS (stimulace integrasy) a INr

(stimulace integrasy zprostředkovaně přes Rev protein) spolu s HAART léčbou zablokovala replikaci HIV-1 a také způsobila zničení buněk s proviry apoptózou (Levin et al., 2010). S další možností jak zničit latentní rezervoár proviru přišla Reuse a její kolegové. Zde jsou použity inhibitory HDAC 1 s aktivátorem prostrainem (Reuse et al., 2009). Tyto látky synergicky aktivují HIV-1 provirus z latentního stavu. Možnosti léčby latentního rezervoáru HIV-1 jsou ale prozatím ve fázi vylepšování a zkoušení na pacientech. Jedná se o dlouhodobé výzkumy, proto bude pravděpodobně ještě nějakou dobu trvat, než budou možnosti léčby vyloučeny či potvrzeny.

Virus HIV-1 se preferenčně replikuje v aktivovaných CD4⁺ T-lymfocytech, které jsou v G_{1b} fázi buněčného cyklu (Korin and Zack, 1998). V latentním stavu je sice provirus v buňce přítomen, ale není transkripčně aktivní a tedy nevznikají infekční viriony. CD4⁺ T-lymfocyty, které jsou v inaktivním stavu, se nacházejí v G₀ fázi buněčného cyklu (Korin and Zack, 1999).

Latentní proviry jsou sice přítomny v napadeném organismu v poměrně malém počtu, ale vydrží v tomto stavu velice dlouho a mohou být aktivovány. Vysoká životnost je dána dlouhým poločasem života CD4⁺ T-lymfocytů, který je v řádu několika let. Jakmile dojde k aktivaci latentního proviru, obnoví se exprese a začne se projevovat nemoc. Na ustavení a udržení latentního stavu HIV-1 se může podílet několik faktorů - přítomnost správných transkripčních faktorů, místo integrace, methylace DNA a chromatinové modifikace.

5.3.2.4 Latentní stav, transkripční faktory a místo integrace

Reaktivace latentního proviru je spojena s přechodem buněk z G₀ fáze buněčného cyklu do stavu, kdy dochází k dělení buněk. Bylo zjištěno, že pro reaktivaci z latentního stavu je potřeba, aby byly přítomny transkripční faktory Sp1, NF-κB a NFAT (Bosque and Planelles, 2009; Kinoshita et al., 1998; Nabel and Baltimore, 1987). Aktivita těchto proteinů je regulována během buněčného cyklu a současně jsou schopny vazby na promotor HIV-1.

V možné reaktivaci latentního proviru hraje roli také místo jeho integrace. Vzhledem k heterogenitě lidského genomu může mít okolí, kam se integruje HIV-1, velký vliv na jeho transkripční aktivitu. HIV-1 se preferenčně integruje do genů, v oblastech s vysokou genovou hustotou a vyšším obsahem CG párů (Elleder et al., 2002). V případě, že byla odděleně studována integrační místa latentních provirů bylo zjištěno, že až v 50 % zkoumaných vzorků bylo místo integrace latentního proviru blízko α-repetitivních elementů, které se nacházejí u oblasti centromerického

heterochromatinu (Jordan et al., 2003). Tedy místa integrace provirů, kde bude později ustavena latence, jsou spíše v oblastech s nižší genovou hustotou a menším počtem CG dinukleotidů a CpG ostrovů (Brady et al., 2009). Právě přítomnost heterochromatinového okolí pak může mít vliv na vytvoření latentního stavu integrovaného HIV-1 (Jordan et al., 2003). Výběr integračního místa má zejména velký vliv na brzkou, na proteinu Tat-nezávislou fázi replikace (Jordan et al., 2001).

5.3.2.5 Epigenetická regulace HIV-1

Roli v udržení latentního stavu proviru může hrát transkripční interference, kdy promotory genů hostitele zabraňují navázání transkripčních faktorů na virové promotory (Duverger et al., 2009; Han et al., 2008). Regulace transkripce HIV-1 vychází z interakce mezi DNA cis-elementy a trans-regulačními proteiny, které se vážou na DNA. Prostorové uspořádání virových promotorů je spojeno s jejich chromatinovými modifikacemi a methylací DNA.

Van Lint a její kolegové provedli experiment, ve kterém byl promotor HIV-1 hyperacetylován. Výsledkem bylo, že došlo k aktivaci proviru (Van Lint et al., 1996). Vyplývá tedy, že existuje spojitost mezi acetylací histonů a aktivací proviru z latentního stavu. Aby HIV-1 provirus mohl vstoupit do latentního stavu, je potřeba přítomnost histonových deacetylás typu 1, HDAC-1. Dimer proteinu p50/p50 přitahuje HDAC-1 k LTR oblasti latentního proviru. Postupně poté dochází k deacetylaci histonů a tím ke změnám struktury chromatinu (Williams et al., 2006).

Dále je potřeba, aby byly přítomny histonová methyltransferasa Suv39H1 a heterochromatinový protein γ HP1. Methyltransferasa Suv39H1 provádí specifickou trimethylaci histonu 3 na lysinu 9, H3K9me3. Methyltransferasa Suv39H1 a protein γ HP1 dohromady zprostředkovávají represi virového promotoru pomocí změny chromatinové struktury (du Chene et al., 2007). Bylo zjištěno, že aktivace HIV-1 LTR promotoru pomocí Tat-zprostředkované reaktivace zahrnuje snížení množství methyltransferasy Suv39H1 a proteinu HP1 γ a redukcí množství H3K9me3, které jsou asociovány s LTR oblastí. Z těchto poznatků vyplývá, že pokud je promotor v inaktivním stavu, jsou všechny zmíněné proteiny asociovány s LTR oblastí a blokují transkripci. Naopak při přechodu do aktivního stavu dochází k jejich uvolnění (du Chene et al., 2007).

Kromě methyltransferasy Suv39H1 je v udržení latence HIV-1 proviru zahrnuta i methyltransferasa G9a (Imai et al., 2010). Tato methyltransferasa provádí dimethylace histonu 3, lysinu 9, H3K9me2. Pokud je tato methyltransferasa produkována ve velkém

množství, dochází k potlačení produkce viru a je ustanoven latentní stav. Naopak pokud dojde k narušení její funkce, začne probíhat virová replikace. Z těchto poznatků vyplývá, že methyltransferasa G9a je důležitá v udržení latentního stavu HIV-1 (Imai et al., 2010). Jak G9a, tak i Suv39H1 fungují jako methyltransferasy modifikující histon 3 na lysinu 9, ale celkově mají odlišnou roli. Vytvářejí různé molekulární vzorce a rozpoznávají jiné histonové modifikace (Tachibana et al., 2001).

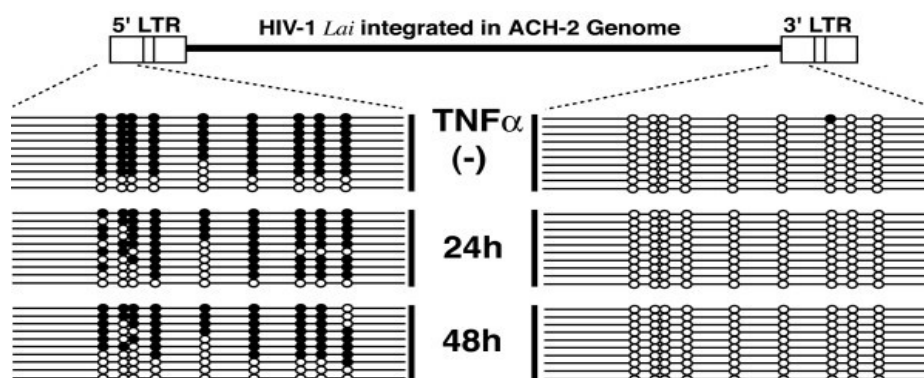
Důležitým proteinem v regulaci HIV-1 je MBD2, který obsahuje vazebnou doménu pro methylované CpG. Pomocí specifické vazby zprostředkovává represi transkripce remodelací chromatinu (Zhang et al., 1999). Pokud byla *in vitro* funkce MBD2 inhibována a byl přidán transkripční faktor NF- κ B, došlo k úplné reaktivaci latentního HIV-1 (Kauder et al., 2009).

5.3.2.6 Methylace HIV-1

Bylo zjištěno, že methylace DNA retrovirových promotorů a enhancerů, které jsou součástí 5' LTR HIV-1, je dalším z mechanismů potlačení transkripce. Z výsledků Bednarika a jeho kolegů vyplynulo, že HIV-1 LTR může být inaktivován methylováním cytosinových zbytků *in vitro* (Bednarik et al., 1987). To viru umožňuje vyhnout se imunitnímu systému hostitele a také HAART terapii.

Novější výzkumy ukazují, že methylace CpG dinukleotidů HIV-1 5' LTR promotorové oblasti je pravděpodobně jedním z velmi důležitých epigenetických regulačních mechanismů, které udržují tento virus v latentním stavu (Blazkova et al., 2009). CpG methylace provirové DNA naproti tomu není nezbytná k ustavení virové latence (Pion et al., 2003). Latentní proviry neobsahující DNA methylování jsou však snadněji reaktivovatelné do transkripčně aktivního stavu (Blazkova et al., 2009).

V latentním stavu je 5' LTR HIV-1 proviru selektivně hypermethylován a pokud dojde k reaktivaci pomocí faktoru TNF- α , je tato oblast částečně demethylována (Ishida et al., 2006). Naopak v 3' LTR oblast může být v latentním stavu hypomethylována a po vystavení proteinu TNF- α k žádným změnám nedochází (Ishida et al., 2006). Obojí znázorněno na obr. 3. Zjištění ohledně methylace 5' LTR podporují i výsledky Blažkové a jejích kolegů – reaktivace HIV-1 promotoru je doprovázena pouze částečnou demethylováním CpG HIV-1 5' LTR oblasti, dochází ke změně methylace histonů a k poklesu H3K9me3, což je spojeno s aktivním chromatinem (Blazkova et al., 2009).



Obr. 3: DNA methylace LTR oblastí HIV-1 proviru integrovaného do genomu ACH-2 buněk. Před přidáním transkripčního faktoru TNF- α je 5' LTR selektivně hypermethylováno, po přidání TNF- α došlo k částečné demethylaci. Zkoumáno 24 a 48 hod po přidání TNF- α . Oblast 3' LTR byla hypomethylována po celou dobu. Převzato od (Ishida et al., 2006). Obecně přijaté značení CpG dinukleotidů je pomocí kolečka. Pokud je zde methylovaný cytosin, je kolečko plné, černé. Pokud je zde methylovaný cytosin, je kolečko plné, černé. Pokud cytosin methylovaný není, tak je kolečko bez výplně, bílé.

5.4 Endogenní retroviry

5.4.1 Úvod

Endogenní retroviry neboli ERV jsou stabilní součástí eukaryotického genomu. Obecně tvoří retrovirové elementy přibližně 8 % lidského genomu (Lander et al., 2001).

Endogenní retroviry, které se vyskytují u člověka, se označují jako HERV, lidské endogenní retroviry. Dělíme je do několika rodin. Členové každé rodiny používají tRNA dopravující stejné aminokyseliny jako primer pro reverzní transkriptasu. Podle zkratky dané aminokyselinou nesou rodiny označení. Toto dělení je uměle vytvořené a nevypovídá nic o příbuznosti nebo strukturních vlastnostech retrovirových elementů. Mezi tyto rodiny patří například HERV-W, HERV-E, HERV-L a HERV-K.

Endogenní retroviry vznikly nezávislou infekcí lidských germinálních buněk exogenními retroviry v průběhu evoluce. Analýza *env* genů ERV rodin poukazuje na postupnou reinfekci retrovirovými elementy. Touto cestou endogenní retroviry zvyšovaly počet svých kopií v hostitelích (Belshaw et al., 2004). Reinfekce mohla probíhat buď mezi liniemi germinálních buněk nebo mohlo docházet i k infekci germinálních buněk viry pocházejícími z buněk somatických (Belshaw et al., 2004). Po prvotní infekci měly endogenní retroviry klasickou provirovou strukturu, tedy obsahovaly 5' a 3' LTR sekvence a mezi nimi geny *gag*, *pol* a *env*. V případě HERV

elementů došlo postupem času k hromadění mutací (bodové mutace, inserce, delece a rekombinace, vznik stop kodónů), což mělo za následek, že tyto retroviry ztratily schopnost replikace. Pro lidské endogenní retroviry tedy platí, že jsou replikačně nekompetentní.

Některé z retrovirových elementů, či některé z jejich regulačních sekvencí, získaly během evoluce nezastupitelnou funkci. Pro jiné je charakteristické, že za normálních okolností jsou umlčovány a z různých patologických příčin je naopak jejich exprese aktivována. Jedním z mechanismů, kterými jsou endogenní retroviry udržovány v inaktivním stavu je epigenetická regulace, DNA methylace a chromatinové modifikace. Na jejich umlčení však může mít vliv i nepřítomnost některých transkripčních faktorů či to, jakým způsobem bude sestřižena vznikající retrovirová RNA.

Mezi lidské endogenní retroviry patří například ERVWE1 (syncytin-1) a ERVFRDE1 (syncytin-2). Endogenní retroviry najdeme samozřejmě i u dalších živočichů. U myši je například endogenní varianta viru myši leukémie (MLV) a u kočkovitých šelem viru kočičí leukémie (FeLV).

5.4.2 Syncytin-1

5.4.2.1 Charakteristika

5.4.2.1.1 Vlastnosti

Syncytin je krásným příkladem toho, že retroviry nemusí být za všech okolností jen škodlivé. Díky tomuto endogennímu retroviru je umožněna správná funkce placenty. U člověka rozlišujeme dva typy syncytinu, syncytin-1 a syncytin-2. „Syncytiny“ jsou důležité pro vývoj placenty i u dalších živočichů. U myši se vyskytují také dva typy syncytinu, syncytin-A a B (Dupressoir et al., 2005), u králíků je to syncytin-Ory1 (Heidmann et al., 2009) a u šelem syncytin-Car1 (Cornelis et al., 2012). Tyto „syncytiny“ jsou vůči sobě homologické.

Syncytin-1 patří do rodiny endogenních retrovirů HERV-W a je kódován lokusem ERVWE1. Obalový glykoprotein, tedy produkt *env* genu tohoto lokusu, je označován jako Syncytin-1. Celý lokus nalezneme na chromosomu 7, v pozici 7q21 – 7q22. V případě syncytinu-1 je ORF intaktní a proto dochází k produkci proteinu (Mi et al., 2000), předtím však musí dojít ke správnému sestřihu retrovirové RNA. Ostatní geny zde přítomné, *gag* a *pol*, obsahují mutace a stop kodóny a tedy z nich nemohou vznikat funkční proteiny.

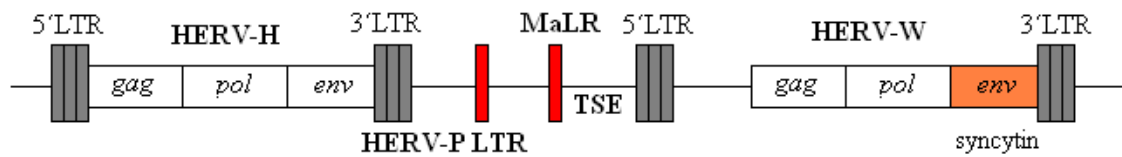
Struktura ERVWE1 odpovídá klasickému provirovému uspořádání. Na 5' konci a 3' konci jsou přítomny LTR sekvence skládající se z oblastí U3, R a U5. Mezi LTR sekvencemi jsou geny *gag*, *pol* a *env* (obr. 4). Bylo zjištěno, že 5' LTR ERVWE1 obsahuje vazebná místa pro transkripční faktory, CAAT box, což je vazebné místo pro specifické transkripční regulátory syncytinu-1, TATA box a vazebné místo pro CAP protein (Prudhomme et al., 2004).

Syncytin-1 je funkčně transmembránovým proteinem a pokud je exprimován na povrchu buněk, je schopen zprostředkovávat jejich fúzi. Polypeptid tvořící Syncytin-1 obsahuje 538 aminokyselin (Mi et al., 2000). Protein Syncytin-1 se skládá ze dvou částí a to z TM části, která je transmembránová, a SU části, které je povrchová a umožňuje interakci s receptorem.

Receptorem pro Syncytin-1 je aminokyselinový přenašečový systém B⁰, ASCT2 (Tailor et al., 1999). Komplex B⁰ je Na⁺-dependentní přenašeč, který transportuje zejména neutrální aminokyseliny jako jsou alanin, glutamin a glycin (Kekuda et al., 1996). Gen kódující tento přenašeč se nachází se na chromosomu 19, v pozici 19q13.3 (Kekuda et al., 1996) a je exprimován v širokém spektru tkání.

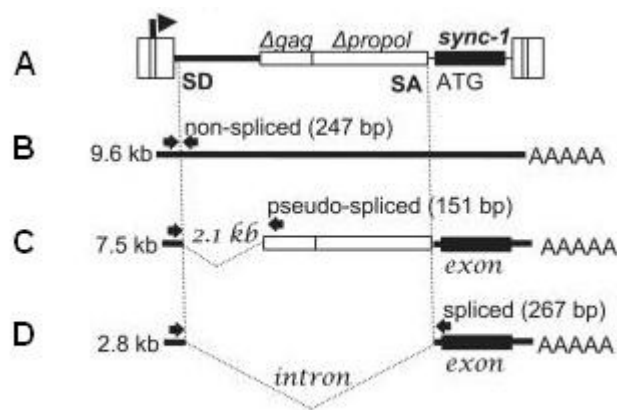
5.4.2.1.2 Transkripce syncytinu-1

Lokus ERVWE1 se nachází v blízkosti dalších dvou endogenních retrovirů, HERV-H a HERV-P. Jejich přítomnost má vliv na expresi z lokusu ERVWE1. Transkripce syncytinu-1 je regulována dvěma různými elementy. Těmi jsou U3 oblast 5' LTR v promotorové oblasti a přilehlá oblast TSE, které se nachází upstream od retrovirového elementu. Oblast TSE funguje jako enhancer a její součástí je vazebné místo pro transkripční faktor GCM1, který je nezbytný pro vývoj placenty (Yu et al., 2002). Další součástí je element MaLR, což je savčí retrotransposon obsahující pouze jednu LTR sekvenci. Regulačním elementem je i LTR sekvence HERV-P (Prudhomme et al., 2004). Znázorněno na obr. 4. Promotorová oblast syncytinu-1, 5' LTR, je cAMP-dependentní. Oblast 3' LTR obsahuje polyadenylační signál (Prudhomme et al., 2004).



Obr. 4: Schéma ERVWE1 lokusu a znázornění okolních endogenních retrovirů. Tenkou čarou je znázorněna genomová DNA, obdélníky retrovirová DNA. Lokus ERVWE1 je složen z 3' a 5' LTR (U3, R, U5), z genů gag, pol a env. Upstream od HERV-W jsou znázorněny regulační elementy MaLR a HERV-P LTR (červeně) a HERV-H endogenní retrovirus. Mezi MaLR a 5' LTR HERV-W leží TSE oblast.

Po transkripci celého ERVWE1 lokusu dochází k sestřihu vzniklé RNA. Mohou vznikat tři typy výsledných mRNA (obr. 5) a to nesestřižená plnodélková mRNA (délka 9,6 kb), úplně sestřižená forma, která obsahuje pouze env gen a dochází z něj k produkci proteinu Syncytinu-1 (délka 2,8 kb) a tzv. pseudoforma mRNA, kde je oproti plnodélkové formě vystřižen 2,1 kb dlouhý intron (délka mRNA 7,5 kb). V placentě je alespoň 5x více úplně sestřižené formy než nesestřižené (Trejbalova et al., 2011).



Obr. 5: Schéma sestřihové strategie RNA vznikající z ERVWE1 lokusu. (A) Schéma ERVWE1 lokusu, který se skládá ze tří genů: gag, pol a env; 2,1 kb dlouhého intronu a dvou LTR sekvencí. (B) Schéma nesestřižené formy, (C) schéma pseudoformy mRNA bez 2,1 kb dlouhého intronu, (D) schéma úplně sestřižené formy obsahující pouze env gen. Převzato od (Trejbalova et al., 2011).

5.4.2.1.3 Exprese syncytinu-1

K expresi syncytinu-1 dochází za fyziologických okolností v placentě, kde je omezena pouze na cytotrofoblasty a indukuje fúzi trofoblastů (Mi et al., 2000). Tímto způsobem se vytváří rozhraní mezi tkání matky a plodu. Lidská placenta je tvořena buňkami, které se nazývají trofoblasty. Ty jsou první vrstvou, která se diferencuje

během embryonálního vývoje. Na začátku těhotenství ženy začnou cytotrofoblastické buňky (kmenové buňky) proliferovat a fúzovat, čímž se vytváří syncytium. Vrstva cytotrofoblastů pod syncytiem velmi prolifерuje. Postupem času se vytvoří mezodermová vrstva a začíná se vytvářet krevní síť. Syncytiotrofoblastová vrstva, syncytium, je nezbytná pro transport živin a plynů k plodu a vytváření hormonů jako jsou placentální laktogen a choriový gonadotropin. V placentě vznikají dva hlavní transkripty ERVWE1, plnodélková forma a úplně sestřižená forma. Slabá exprese ERVEW1 byla nalezena ve varlatech, kde ale vzniká pouze nesestřižená forma a tedy zde k vytváření proteinu Syncytinu-1 nedochází (Mi et al., 2000).

Zvýšená exprese Syncytinu-1 byla zjištěna i v patologickém kontextu a to u pacientů s roztroušenou sklerózou (Perron et al., 1997), schizofrenií (Karlsson et al., 2001) a u nádoru endometria (Strick et al., 2007). Snížená exprese Syncytinu-1 koreluje s nedostatečnou nebo pozdě vytvářenou syncytiotrofoblastovou vrstvou v případech těhotenství s Downovým syndromem (Frendo et al., 2000). Nedostatečná exprese Syncytinu-1 i 2 je spojena s preeklampií (Chen et al., 2008; Vargas et al., 2011), která má za následek abnormality ve struktuře placenty a tím i špatný vývoj plodu (Kudo et al., 2003).

5.4.2.2 Exprese endogenních retrovirů v placentě a jejich regulace

V placentě dochází k expresi více různých endogenních retrovirů. Jednou z možností, proč tomu tak je, může být, že v placentě je obecně nižší stupeň methylace v porovnání s dalšími tkáněmi. Lidská placenta vykazuje o 20 % nižší celkovou methylaci než mozek, játra a periferní krevní lymfocyty (Fuke et al., 2004; Gama-Sosa et al., 1983). Kromě ERVWE1 dochází v placentě i k expresi z lokusů ERVFDE1 (Malassine et al., 2007), ERV3 (Kato et al., 1987) a env(P)b (Blaise et al., 2005). Tyto endogenní retroviry jsou fylogeneticky nepříbuzné. V placentě se tak více LTR HERV genů chová jako alternativní promotory buněčných genů.

5.4.2.3 Methylace syncytinu-1

5.4.2.3.1 Stupeň methylace v různých tkáních

Většina promotorů endogenních retrovirů je svým hostitelským organismem methylována, tedy je transkripčně inaktivní. Jedná se o methylaci promotorových oblastí obsažených v LTR sekvencích. Pro syncytin-1 platí, že v jiných tkáních než v placentě je jeho promotorová oblast za fyziologických podmínek silně methylována,

a proto dochází k velmi slabé nebo žádné expresi.

Vyšší exprese Syncytinu-1 jinde než v placentě je spojena s nádory a s fúzí buněk, proto je potřeba, aby exprese Syncytinu-1 byla velmi dobře regulována. Potlačení transkripce pomocí methylace DNA v promotorové oblasti je jedním z hlavních způsobů, jakými je zabráněno expresi Syncytinu-1 v dalších tkáních a tím zabráněno nechtěné fúzi buněk (Matouskova et al., 2006). Kromě methylace jsou zde důležitým mechanismem i chromatinové modifikace. V neplacentálních tkáních je silná methylace LTR sekvence syncytinového genu, což je doprovázeno deacetylací a trimetylací H3K9, histon 3, lysin 9 (Trejbalova et al., 2011).

V případě tkáně varlat bylo zjištěno, že methylace promotorů neodpovídá sice slabé, ale detekovatelné expresi Syncytinu-1 (Mi et al., 2000). Tato neobvyklá situace může být způsobena některými epigenetickými mechanismy, které jsou charakteristické pro tkáň varlat a pro buňky mužské germinální linie (McCarrey et al., 2005). Další možností je téměř nepozorovatelný pokles methylace, který je dostačující pro slabou hladinu exprese. V případě HeLa buněk a lymfoblastických MCF buněk, které mají silně methylované 5' LTR ERVWE1, nebyla pozorována exprese (Trejbalova et al., 2011).

Z výše uvedených poznatků vyplývá, že epigenetické potlačení exprese syncytinu je důležitým, ale nikoli jediným mechanismem, který ovlivňuje transkripci. V jiných tkáních než v placentě je 5' LTR ERVWE1 methylováno a proto syncytin-1 není exprimován vůbec a nebo jen v malém množství. V regulaci je důležité i zahrnutí dalších procesů, jako je sestřih a úprava ERVWE1 mRNA (Trejbalova et al., 2011). Existuje i spojení mezi epigenetickými modifikacemi a sestřihem. Demethylace promotorové oblasti syncytinu-1 je nutná pro zahájení bazální transkripce, ale není dostatečná (Matouskova et al., 2006). Jsou zapotřebí ještě další faktory.

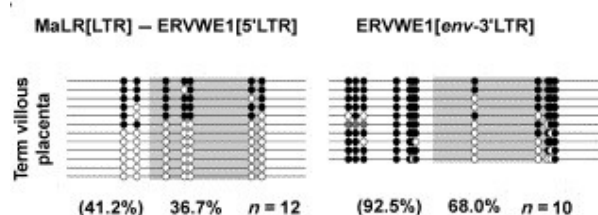
Stupeň methylace promotorových oblastí ERVWE1 v různých tkáních se pohybuje od 85 do 98,2 % methylovaných CpG (Gimenez et al., 2009).

5.4.2.3.2 Stupeň methylace v buňkách placenty

V buňkách placenty dosahuje methylace 5' LTR přibližně 40%, což je o dost méně než v ostatních tkáních (Gimenez et al., 2009; Matouskova et al., 2006). Oblasti 5' LTR a 3' LTR patří ke stejnému lokusu ERVWE1, ale stupeň jejich methylace se v placentě liší (obr. 6).

Vyšší methylace 3' LTR je pravděpodobně ochranou před kompeticí mezi 3' LTR a 5' LTR jako promotorovými oblastmi (Gimenez et al., 2009) a také může

zabraňovat transkripci z buněčných genů 3' LTR sekvencí.



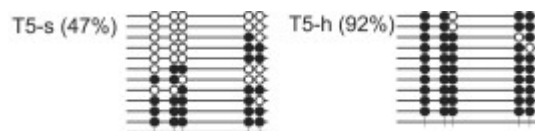
Obr. 6: Znárodnění rozdílů ve stupni methylace u ERVWE1 3' LTR a ERVWE1 5' LTR/MaLR LTR promotorových sekvencích v placentě. V buňkách placenty je MaLR LTR/ERVWE1 5' LTR methylováno z přibližně 40%, kdežto promotorová oblast 3' LTR ERVWE1 je methylována z přibližně 92%, tedy výrazně více. Převzato od (Gimenez et al., 2009).

Stupeň methylace ostatních retrovirových LTR je v placentárních fibroblastech je vyšší, 76,9 – 93,9 %. Množství methylace se liší u jednotlivých LTR různých retrovirových elementů (Gimenez et al., 2009).

Na základě výše zmíněných prací vyplývá, že nižší stupeň methylace promotorové oblasti syncytinu-1 koreluje s jeho vysokou hladinou exprese v placentě.

5.4.2.3.3 Změna stupně methylace promotoru syncytinu-1 v patologických procesech

Změna exprese syncytinu-1 je spojena s nádory germinálních buněk varlat. Bylo zjištěno, že ve zdravé tkáni varlat je celkové v genomu methylováno 82 – 100 % CpG (Gimenez et al., 2010). U seminomů může docházet k hypomethylaci promotorové oblasti, nemusí tomu tak však být ve všech případech (Trejbalova et al., 2011). Změna stupně methylace je znázorněna na obr. 7. V seminomech dochází současně k expresi nesetřizené i úplně sestřizené formy syncytinu-1 (Gimenez et al., 2010; Trejbalova et al., 2011). Úplně sestřizené formy je produkováno 2x – 4x více než nesestřizené formy, což se zdá být jedinečnou vlastností tohoto typu nádoru (Trejbalova et al., 2011).



Obr. 7: Srovnání stupně methylace DNA promotorové oblasti mezi zdravou tkání varlat (T5-h) a seminomem (T5-s). V tomto případě dochází k hypomethylaci. Převzato od (Trejbalova et al., 2011).

5.4.3 Syncytin-2

Syncytin-2 je kódován env genem lokusu ERVFRDE1 a je stejně jako syncytin-1 exprimován v placentě, kde má fúzogenní aktivitu. Fúze buněk pomocí syncytinu-2 je závislá na přítomnosti sacharidového přenašeče MSFD2 (Esnault et al., 2008). Pro syncytin-2 je tedy přenašeč MSFD2 receptorem. Syncytin-2 patří do rodiny HERV-FRD a kromě zprostředkovávání fúze buněk má i imunosupresivní funkci.

U syncytinu-2 vznikají dva typy transkriptů a to RNA plné délky a poté sestřihem upravený transkript dlouhý 3,1 kb, z něhož translací vzniká protein (Vargas et al., 2009). Protein syncytin-2 je obvykle lokalizován na membránách v místě, kde spolu buňky fúzí a tedy se také účastní fúze buněk placenty (Vargas et al., 2009).

Syncytin-2 je evolučně starší než syncytin-1. Nalezneme jej funkční i u tzv. opic starého světa, které sice obsahují ve svém genomu i lokus pro syncytin-1 ale ten je v inaktivním stavu.

6. Praktická část

6.1 Cíl práce

Cílem praktické části bakalářské práce bylo vytvořit konstrukt tvořený expresním plasmidem s kódující sekvencí syncytinu-1, který je schopen jej exprimovat bez předchozího sestřihu. Tato schopnost navýšení exprese bude později sloužit ke studiu regulace exprese syncytinu-1 oproti sestřihu. Cílem této bakalářské práce je tento konstrukt připravit a potvrdit zvýšenou expresi syncytinu-1 v transfekovaných buňkách.

6.2 Materiály a metody

PCR

Kódující sekvenci syncytinu-1 jsme amplifikovali pomocí Phusion Hot Start Polymerasy (2U/μl, Finnzymes) z BeWo cDNA za použití primerů obsahujících restriční místo *NotI* (podtržené) a start kodón (tučně):

sync flank FW: 5' AAGCGGCCGCAAAGTAACTAAAATCATAAATCCCCATG 3'

sync RV: 5' AAGCGGCCGCCTAACTGCTTCCTGCTGAATTG 3'

Reakce o celkovém objemu 20 μl byla provedena podle protokolu Finnzymes pro Phusion Hot Start polymerasu. Bylo použito 0,4 U Phusion Hot Start polymerasy a 200 ng BeWo cDNA. PCR bylo provedeno následujícím způsobem: úvodní denaturace 30 s při 98°C, denaturace 10 s při 98°C, přisednutí primerů 30 s při 65°C,

polymerace 40 s při 72°C a závěrečná polymerace 10 min při 72°C, celkově 30 cyklů. Následně byly na 3' konce namnožených molekul pomocí rTaq polymerasy (TaKaRa, 5 U/μl) přidány A konce. Získané fragmenty délky 1662 bp jsme poté izolovali z 1% ultra čistého agarosového gelu (Qiagen, QIAEX extraction kit II, 150).

Ligace do plasmidu a transformace bakterií

Fragmenty syncytinu-1 s upravenými konci jsme ligovali do plasmidu pGEM-T Easy (50 ng/μl, Promega) pomocí T4 DNA ligasy (400 U/μl, NEB). Ligační směs byla připravena podle protokolu NEB pro ligaci pomocí T4 DNA ligasy. Bylo použito 400 U T4 DNA ligasy, 50 ng plasmidu pGEM-T Easy a 1 μg fragmentu. Ligace probíhala přes noc v lednici při +4°C.

Ligační směs byla transformována do STBL2 bakterií (kmen *Escherichia coli*) – 25 s tepelný šok ve 42°C ve vodní lázni, 2 min na ledu a poté 2 hod třepání v LB při 30°C. Následně byly bakterie vysety na agarové misky a ampicilinem a modrobílou selekcí pomocí X-Gal (Maneko IPTG ready solution).

Výběr kolonií

Po 20 hod bylo z misek vybráno 10 bílých kolonií a ty byly přemístěny do LB s ampicilinem (1 μg/ml) pro získání templátu pro PCR a na následné zaočkování. Provedli jsme PCR s rTaq polymerasou (5 U/μl, TaKaRa) a primery sync-cds, které amplifikují 312 bp dlouhou sekvenci uvnitř kódující sekvence syncytinu-1. Reakce o celkovém objemu 25 μl byla připravena podle protokolu TaKaRa pro rTaq polymerasu. Byla použita 1 U rTaq polymerasy a 1,5 μl templátu z bakteriálních kolonií resuspendovaných ve 20 μl LB. PCR bylo provedeno následujícím způsobem: úvodní denaturace 5 min při 95°C, denaturace 20 s při 95°C, přisednutí primerů 20 s při 60°C, polymerace 40 s při 72°C a závěrečná polymerace 10 min při 72°C, celkově 30 cyklů. Výsledek byl detekován pomocí elektroforézy, 1% agarosový gel, napětí 95 V. Vybrané kolonie obsahující syncytin-1 byly zaočkovány do LB s ampicilinem pro miniprep a nechány třepat přes noc ve 30 °C.

sync-cds FW: 5'AGCCCCGCAACAAAAGAGTA 3'

sync-cds RV: 5' CAGTGACGATTCCGGATTGA 3'

Miniprep (izolace plasmidové DNA)

Pro izolaci plasmidové DNA byla použita metoda miniprep, kit firmy Qiagen, Plasmid Mini Purification Protocol. Získané pelety tvořené plasmidovou DNA jsme

rozpustili ve 30 μ l pufru T₁₀E₀₁. Po rozpuštění bylo provedeno kontrolní štěpení restriční endonukleasou *NotI* (10 U/ μ l, NEB).

Pro štěpicí reakci o celkovém objemu 20 μ l bylo použito: 5 U *NotI*, pufr 3 1x (NEB) a 1 μ g templátu. Štěpení probíhalo 2 hod při 37°C. Výsledek štěpení byl detekován pomocí elektroforézy. Pozitivní kolonie byly zaočkovány do LB s ampicilinem na midiprep.

Midiprep (izolace plasmidové DNA)

Pro izolaci plasmidové DNA metodou midiprep byl použit kit firmy Qiagen, QIAfilter Plasmid Midi.

Získané pelety byly rozpuštěny v odpovídajícím množství T₁₀E₀₁ pufru. Vzorky jsme si nechali osekvenovat. Pro sekvenaci byly použity univerzální primery M13pUC forward a reverse. Tyto primery nasedají na pGEM-T Easy plasmid blízko klonovacího místa. Sekvenční reakce byla provedena na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy, v Laboratoři sekvence DNA. Kolonie se správnou sekvencí syncytinu-1 byla vybrána pro další klonování.

M13pUC FW: 5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'

M13pUC RV: 5' TCACACAGGAAACAGCTATGAC 3'

Vyštěpení z plasmidu a ligace do expresního plasmidu

Pomocí restriční endonukleasy *NotI* (10 U/ μ l, NEB) jsme vyštěpili fragment syncytinu-1 o délce 1662 bp z pGEM-T Easy plasmidu. Provedli jsme dvě restriční reakce, každá o objemu 20 μ l. V jedné reakci došlo k vyštěpení fragmentu syncytinu-1 z pGEM-T Easy plasmidu, ve druhé k linearizaci plasmidu pcDNA3. Pro každou restriční reakci bylo použito 5 U *NotI*, pufr 3 1x (NEB) a 3 μ g templátu, v jednom případě plasmid pGEM-T Easy s fragmentem a ve druhém pcDNA3. Restriční reakci jsme nechali probíhat 2 hod ve 37°C. Plasmid pcDNA3 byl dále defosforylován přidáním antarktické fosfatasy (5 U/ μ l, NEB) – přidáno 5 U, 1 μ l pufru 3 10x a voda do celkového objemu 30 μ l. Výsledek štěpení a defosforylovaný plasmid byl nanesen na ultra pure 1% agarosový gel pro izolaci a fragment syncytinu-1 byl ligován do plasmidu pcDNA3. Ligace probíhala přes noc v 16°C pomocí T4 DNA ligasy (400 U/ μ l, NEB). Ligační směs o celkovém objemu 15 μ l byla připravena dle protokolu NEB pro ligaci pomocí T4 DNA ligasy. Bylo použito 400 U T4 DNA ligasy, 12 ng pcDNA3 a 40 ng syncytinu-1.

Transformace bakterií, výběr kolonií

Stejným způsobem, jako je zmíněno výše, jsme plasmid pcDNA3 s fragmentem syncytinu-1 zatransformovali do STBL2 bakterií, nechali narůst kolonie a pomocí PCR reakce s sync-cds primery jsme vybrali kolonie se zaintegrováním syncytinu-1 v plasmidu pcDNA3. PCR reakce proběhla stejným způsobem, jako je popsáno v podkapitole o výběru kolonií. Z pozitivních kolonií byl proveden miniprep podle výše popsaného protokolu.

Kontrolní štěpení orientace integrace

Pomocí štěpení restrikční endonukleasou *Bgl*/II (10 U/μl, NEB) byla zjištěna orientace, s jakou se fragmenty integrovaly do plasmidu pcDNA3. Pro restrikční reakci o celkovém objemu 20 μl bylo použito: 4 U *Bgl*/II, pufr 3 1x a 1 μg templátu. Štěpení probíhalo 3 hodiny při 37°C. Vybraná kolonie s vhodnou orientací integrace byla zaočkována na midiprep (Qiagen, QIAfilter Plasmid Midi) a druhý den z ní byl vyizolován plasmid obsahující syncytin-1. Pro analýzu exprese v buněčné kultuře jsme vybrali kolonie sync-col. 12, sync-col. 15 a sync-col. 16.

Vysetí buněk

Použili jsme buňky pocházející z lidského střevního karcinomu, které obsahují dvojitý knock-out v genech *Dnmt1* a *Dnmt3b*. Na šesti jamkovou kultivační destičku jsme vyseli HCT 1-3B⁻ buňky v počtu 500 000 na jamku, buňky zalili médiem se sérem a nechali 24 hodin buňky přichytit k povrchu v termostatu při 37°C a 5% CO₂. Použité médium bylo složeno z DMEM kultivačního média, 5% FCS a 5% CS.

Transfekce buněk

Buňky HCT 1-3B⁻ jsme transfekovali pomocí transfekčního činidla X-TREME HP DNA (Roche) v poměru 1 μg plasmidu ku 4 μl transfekčního činidla. Transfekovali jsme všechny tři vybrané kolonie, které obsahovaly pcDNA3 vektor se zaintegrováním syncytinu-1. Transfekce byla provedena podle protokolu pro transfekci činidlem X-TREME HP podle protokolu Roche DNA. Buňky jsme dali do termostatu, 37°C, 5% CO₂. Celkově jsme si tedy připravili 4 transfekované kultury: HCT 1-3B⁻ sync-col.12, HCT 1-3B⁻ sync-col.15, HCT 1-3B⁻ sync-col.16 a HCT 1-3B⁻ netransfekované.

Izolace RNA

Izolaci RNA jsme provedli dle protokolu Molecular Research Centre, INC., Isolation of Total RNA - Abbreviated Protocol.

cDNA

Z izolované RNA (1 µg) z buněk jsme připravili cDNA. K přípravě byla použita reverzní transkriptasa M-MLV (200 U/µl, Promega). Jako primery byly použity náhodné hexanukleotidy, p(dN)₆ (0,5 µg/µl, Promega). Pro degradaci DNA, která by se v reakci mohla vyskytovat byla použita DNasa (2 U/µl, NEB). Působení DNasy probíhalo následně: 15 min při 37°C a 5 min při 70°C pro inaktivaci DNasy. Pro tuto reakci o celkovém objemu 46,25 µl bylo použito: 1 µg RNA, M-MLV pufru 5x a 2 U DNasy. Samotná příprava cDNA probíhala 1 hod při 37°C a 10 min při 70°C v celkovém objemu 50 µl. Pro tuto reakci bylo k předchozí přidáno 1 µg p(dN)₆, 12,5 mM dNTPs a 100 U M-MLV. Od každého vzorku byla vyrobena RT+ i RT-, kde k RT- nebyla přidána reverzní transkriptasa. Vzniklá cDNA byla naředěna dalšími 50 µl vody do celkového objemu 100 µl.

Kvantitativní PCR

Pro kvantitativní PCR byly připraveny dvě směsi. Jedna obsahující primery pro testovaný gen sync-cds a druhá s primery pro housekeeping gen RPII, pomocí nichž se namnoží gen pro RNA polymerasu II α, jeho množství slouží pro normalizaci množství molekul. PCR reakce o objemu 20 µl pro každou jamku byla připravena podle protokolu MESA GREEN qPCR SYBR® Assay No ROX (Eurogentec). PCR mixy byly rozpipetovány po 18 µl do 96 jamkové destičky a k nim bylo přidáno po 2 µl cDNA. Pro analýzu byly použity čtyři typy vzorků, tři typy transferovaných buněk a netransferované buňky. Každý vzorek byl použit v triplicátu, jako negativní kontrola byly použity triplikáty blanků pro oba mixy. Negativní kontroly obsahovaly vodu místo cDNA templátu.

Detekce pomocí SYBR GREEN I. Kvantitativní PCR proběhlo následujícím způsobem: úvodní deturace 5 min 95°C, denaturace 15 s 95°C, přisednutí primerů 20 s 60°C, polymerace 25 s 72°C a závěrečná polymerace 10 min 72°C, počet cyklů 40.

Primery pro RPII: FW 5' GCACCACGTCCAATGCACT 3'

RV 5' GTGCGGCTGCTTCCATAA 3'

Primery pro sync-cds: FW 5' AGCCCCGCAACAAAAGAGTA 3'

RV 5' CAGTGACGATTCCGGATTGA 3'

6.3 Výsledky

Pro získání sekvence syncytinu-1 jsme tuto oblast amplifikovali pomocí PCR a specifických primerů. Získali jsme fragment délky 1662 bp. Tento fragment jsme izolovali z ultra pure agarosového gelu, ligovali do plasmidu pGEM-T Easy a transformovali do STBL2 bakterií. Na základě modrobílé selekce jsme vybrali pozitivní kolonie se zaintegrovanou sekvencí a její přítomnost ještě ověřili pomocí specifických primerů pro syncytin-1, sync-cds primery, získali jsme požadovaný fragment délky 312 bp.

Podle výsledku kontroly jsme vybrali čtyři kolonie, ze kterých jsme metodou miniprep izolovali plasmidy a podrobili je kontrolnímu štěpení pomocí restrikční endonukleasy *NotI*. Tímto štěpením jsme navíc i prověřili funkčnost restrikčních míst. Podle výsledku kontroly jsme vybrali dvě kolonie, ze kterých jsme metodou midiprep izolovali plasmidy a pomocí specifických primerů jsme nechali sekvenovat integrovanou syncytinovou sekvenci, abychom měli jistotu, že je tato sekvence bez mutací.

Pomocí restrikční endonukleasy *NotI* jsme vyštěpili fragment z plasmidu pGEM-T Easy a ligovali jej do expresního plasmidu pcDNA3. Opět jsme zatransformovali do STBL2 bakterií, vybrali pozitivní kolonie, které obsahovaly integrovanou sekvenci syncytinu-1 a izolovali plasmidy metodou miniprep. U vybraných pozitivních kolonií jsme provedli štěpení pomocí restrikční endonukleasy *BglII*, čímž jsme zjistili orientaci, se kterou se fragment vložil do vektoru. Byly vybrány tři kolonie se správnou orientací fragmentu, syn-col.12, sync-col.15 a sync-col.16.

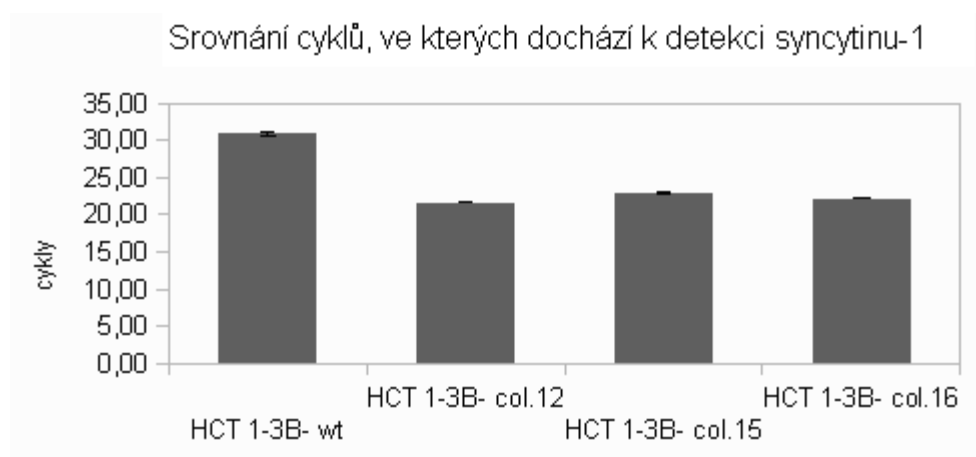
Expresní plasmidy pcDNA3 s integrovaným fragmentem syncytinu-1 jsme izolovali metodou midiprep a pak je transientně transfekovali do HCT 1-3B⁺ buněk, po 2 dnech jsme buňky sklídili, izolovali RNA, vyrobili cDNA a použili ji pro kvantitativní RT-PCR.

Hodnoty cyklů C_q, ve kterých se začal detekovat syncytin-1 a RPII z RT-PCR, byly zprůměrovány pro jednotlivé triplikáty. Cykly C_q pro RT- jsou pozdní, což ukazuje, že vzorky obsahovaly minimální množství DNA kontaminací. Hodnoty C_q pro RPII potvrzují, že izolace RNA a výroba cDNA proběhly dobře. Hodnoty C_q u RPII pro jednotlivé vzorky si odpovídají, je zde pouze minimální rozdíl, který je možné zanedbat, tedy není nutné pro srovnávání hodnoty C_q pro sync-cds normalizovat na C_q pro RPII. Hodnoty C_q sync-cds a jejich porovnání jsou znázorněny v grafu 1, hodnoty C_q RPII a C_q sync-cds RT- v tabulce 1. Na obr. 8 a 9 jsou znázorněny křivky

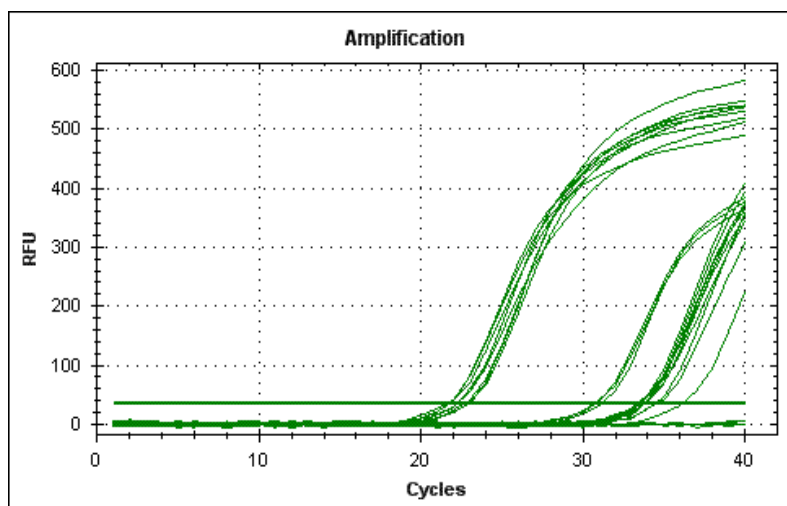
představující intenzity Sybr Green fluorescence v závislosti na počtu cyklů pro syncytin-1 a RPII. Hodnota C_q koreluje s množstvím zkoumané molekuly ve vzorku – čím nižší cyklus C_q, ve kterém se začne objevovat, tím větší množství molekul je ve vzorku obsaženo. Při rozdílu C_q o jeden cyklus je při 100% účinnosti amplifikace dvojnásobný rozdíl v počátečním počtu molekul.

	C _q RPII	směrodatná odchylka C _q RPII	C _q sync-cds RT-	směrodatná odchylka C _q sync-cds RT-
HCT 1-3B ⁻ wt	23,60	0,19	36,13	0,00
HCT 1-3B ⁻ sync-col. 12	23,62	0,23	33,54	0,16
HCT 1-3B ⁻ sync-col. 15	23,48	0,05	34,21	0,46
HCT 1-3B ⁻ sync-col. 16	23,76	0,19	33,56	0,24

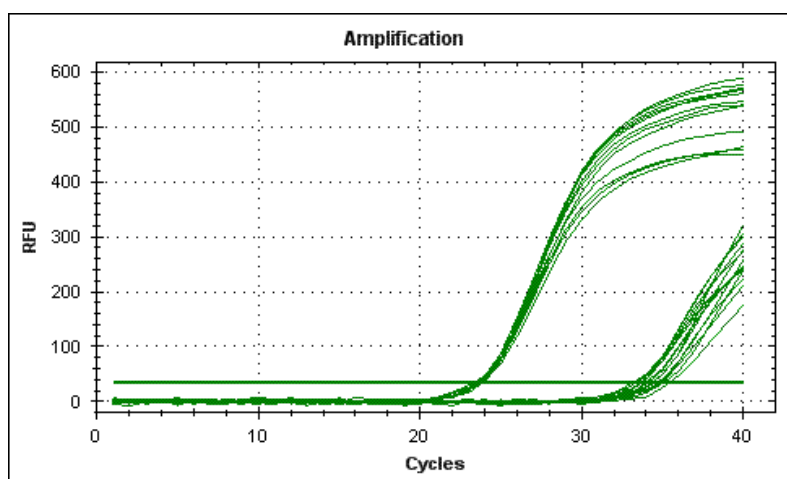
Tabulka 1: Tabulka obsahuje hodnoty C_q pro RPII a sync-cds RT- a jejich směrodatné odchylky. Je zřetelné, že hodnoty C_q pro RT- jsou pozdní, RNA tedy obsahovala jen minimální množství DNA kontaminace. Jednotlivé triplikáty si svými hodnotami byly velmi blízké, což jde vidět na poměrně nízkých hodnotách směrodatných odchylek.



Graf 1: Srovnání cyklů C_q hodnot pro sync-cds. Z grafu je zřejmé, že ve vzorku HCT 1-3B⁻, který byl netransfekovaný je velmi nízký počet endogenních molekul syncytinu-1, zatímco v buňkách obsahujících náš vytvořený expresní plasmid se syncytinem-1, dochází k jeho účinné expresi. Rozdíl mezi transferovanými a netransfekovanými buňkami představuje cca 8 cyklů.



Obr. 8: Srovnání cyklů, ve kterých se je detekována přítomnost sekvence syncytinu-1. Křivky vlevo odpovídají vzorkům RT+, vpravo RT-. Je zřejmé, že v RT- vzorcích se vyskytuje mnohem menší množství sekvencí syncytinu-1. Z grafu jde vidět, že první sekvence syncytinu-1 jsou detekovány na konci 21. cyklu a že si jsou hodnoty C_q u RT+ velmi podobné.



Obr. 9: Srovnání cyklů, ve kterých začínají být detekovány sekvence RPII. Křivky více vlevo odpovídají vzorkům RT+, více vpravo RT-. Je zřetelné, že v RT- vzorcích je obsaženo mnohem menší množství sekvencí RPII. Z grafu jde vidět, že v RT+ vzorcích jsou první sekvence RPII detekovány na konci 23. cyklu.

6.4 Diskuze

Pomocí amplifikace kódující sekvence syncytinu-1 jsme připravili fragment délky 1662 bp, obsahující navíc, na rozdíl od klasické sekvence, ještě *NotI* restrikční místo. Tento fragment jsme nejprve ligovali do pGEM-T Easy plasmidu a transformovali jej do bakterií STBL2. Poté jsme ze sekvenčně ověřeného klonu pomocí *NotI* restrikční endonukleasy vyštěpili fragment syncytinu-1 a ligovali jej do expresního plasmidu pcDNA3, který obsahuje funkční promotorovou oblast, díky které bude docházet k expresi syncytinu-1. Syncytin-1 v pcDNA3 jsme poté

transfekovali do HCT 1-3B⁺ buněk. Po dvou dnech jsme buňky sklídili pro izolaci RNA, RNA izolovali a připravili pomocí reverzní transkripce cDNA. Kvantifikaci množství vytvořených molekul syncytinu-1 jsme určili pomocí kvantitativního RT-PCR.

Z výsledků RT-PCR vyplývá, že se celý sled úkonů povedl a byla úspěšná i transientní transfekce HCT 1-3B⁺ buněk. Z dat vyplývá, že v netransferovaných buňkách je exprese endogenního syncytinu-1 z jeho vlastního LTR promotoru velmi nízká. Naproti tomu exprese v transfekovaných buňkách je o osm cyklů (2^8 , tedy 256x) vyšší. Exprese syncytinu-1 je zde pod kontrolou promotoru CMV, který je součástí vektoru pcDNA3 a nepodléhá při transientní transfekci epigenetické regulaci, jako je tomu v případě endogenního genu. Získali jsme tedy funkční plasmid účinně exprimující syncytin-1.

7. Závěr

Epigenetická regulace retrovirů, tedy jejich provirové DNA integrované do genomu hostitele, se účastní regulace jejich transkripce. Studium těchto epigenetických regulací přispívá k pochopení patologických změn způsobených změnou exprese a může tak přinést možnost léčby nebo zmírnit některá onemocnění.

V případě syncytinu-1 má změna regulace za následek zvýšení exprese proteinu, což způsobuje, že dochází k fúzi buněk. Zvýšená exprese Syncytinu-1 je pak spojena například s nádory germinálních buněk varlat. Methylace DNA a chromatinové modifikace se podílejí na tkáňově specifické regulaci exprese. Prozatím ale není známo, které další faktory se regulace účastní a které mechanismy zodpovídají za změnu methylace DNA.

V případě HIV-1 je studium chromatinových modifikací a methylace DNA spojeno s latentním stavem proviru. Buňky obsahující latentní provirovou DNA zůstávají nedotčeny po HAART léčbě. Pokud dojde k vysazení léčiv nebo k aktivaci imunitního systému, latentní proviry se aktivují, začnou se produkovat infekční částice a může dojít k propuknutí AIDS. Vzhledem k tomu, že HAART léčba je zatím nejlepší dostupnou léčbou, je v tuto chvíli důležité zjistit, jakým způsobem by se dal zrušit latentní stav a tak se umožnilo zničení virového rezervoáru, což by vedlo k úplnému vyléčení z infekce HIV-1 virem.

Chromatinové modifikace a methylace DNA tedy zodpovídají za regulaci exprese jak u endogenních, tak i u exogenních retrovirů.

8. Použitá literatura

- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211.
- Barat, C., Lullien, V., Schatz, O., Keith, G., Nugeyre, M.T., Grüninger-Leitch, F., Barré-Sinoussi, F., LeGrice, S.F., and Darlix, J.L. (1989). HIV-1 reverse transcriptase specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *EMBO J* 8, 3279-3285.
- Bednarik, D.P., Mosca, J.D., and Raj, N.B. (1987). Methylation as a modulator of expression of human immunodeficiency virus. *J Virol* 61, 1253-1257.
- Bellamy, A.R., Gillies, S.C., and Harvey, J.D. (1974). Molecular weight of two oncornavirus genomes: derivation from particle molecular weights and RNA content. *J Virol* 14, 1388-1393.
- Belshaw, R., Pereira, V., Katzourakis, A., Talbot, G., Paces, J., Burt, A., and Tristem, M. (2004). Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4894-4899.
- Bestor, T.H. (1998). Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* 393, 311-312.
- Blaise, S., de Parseval, N., and Heidmann, T. (2005). Functional characterization of two newly identified Human Endogenous Retrovirus coding envelope genes. *Retrovirology* 2, 19.
- Blazkova, J., Trejbalova, K., Gondois-Rey, F., Halfon, P., Philibert, P., Guiguen, A., Verdin, E., Olive, D., Van Lint, C., Hejnar, J., *et al.* (2009). CpG methylation controls reactivation of HIV from latency. *PLoS Pathog* 5, e1000554.
- Bosque, A., and Planelles, V. (2009). Induction of HIV-1 latency and reactivation in primary memory CD4+ T cells. *Blood* 113, 58-65.
- Brady, T., Agosto, L.M., Malani, N., Berry, C.C., O'Doherty, U., and Bushman, F. (2009). HIV integration site distributions in resting and activated CD4+ T cells infected in culture. *AIDS* 23, 1461-1471.
- Cornelis, G., Heidmann, O., Bernard-Stoecklin, S., Reynaud, K., Véron, G., Mulot, B., Dupressoir, A., and Heidmann, T. (2012). Ancestral capture of syncytin-Car1, a fusogenic endogenous retroviral envelope gene involved in placentation and conserved in Carnivora. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E432-441.
- Craigie, R., Fujiwara, T., and Bushman, F. (1990). The IN protein of Moloney murine leukemia virus processes the viral DNA ends and accomplishes their integration in vitro. *Cell* 62, 829-837.
- du Chene, I., Basyuk, E., Lin, Y.L., Triboulet, R., Knezevich, A., Chable-Bessia, C., Mettling, C., Baillat, V., Reynes, J., Corbeau, P., *et al.* (2007). Suv39H1 and HP1gamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. *EMBO J* 26, 424-435.
- Dupressoir, A., Marceau, G., Vernochet, C., Bénit, L., Kanellopoulos, C., Sapin, V., and Heidmann, T. (2005). Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 725-730.
- Duverger, A., Jones, J., May, J., Bibollet-Ruche, F., Wagner, F.A., Cron, R.Q., and Kutsch, O. (2009). Determinants of the establishment of human immunodeficiency virus type 1 latency. *J Virol* 83, 3078-3093.
- Elleder, D., Pavlíček, A., Paces, J., and Hejnar, J. (2002). Preferential integration of human immunodeficiency virus type 1 into genes, cytogenetic R bands and GC-rich DNA regions: insight from the human genome sequence. *FEBS Lett* 517, 285-286.
- Esnault, C., Priet, S., Ribet, D., Vernochet, C., Bruls, T., Lavialle, C., Weissenbach, J., and Heidmann, T. (2008). A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17532-17537.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.

Frendo, J.L., Vidaud, M., Guibourdenche, J., Luton, D., Muller, F., Bellet, D., Giovagrandi, Y., Tarrade, A., Porquet, D., Blot, P., *et al.* (2000). Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 3700-3707.

Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1827-1831.

Fuke, C., Shimabukuro, M., Petronis, A., Sugimoto, J., Oda, T., Miura, K., Miyazaki, T., Ogura, C., Okazaki, Y., and Jinno, Y. (2004). Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet* 68, 196-204.

Furtado, M.R., Callaway, D.S., Phair, J.P., Kunstman, K.J., Stanton, J.L., Macken, C.A., Perelson, A.S., and Wolinsky, S.M. (1999). Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 340, 1614-1622.

Gama-Sosa, M.A., Slagel, V.A., Trewyn, R.W., Oxenhandler, R., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., and Ehrlich, M. (1983). The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 11, 6883-6894.

Gaudet, F., Rideout, W.M., 3rd, Meissner, A., Dausman, J., Leonhardt, H., and Jaenisch, R. (2004). Dnmt1 expression in pre- and postimplantation embryogenesis and the maintenance of IAP silencing. *Mol Cell Biol* 24, 1640-1648.

Gimenez, J., Montgiraud, C., Oriol, G., Pichon, J.P., Ruel, K., Tsatsaris, V., Gerbaud, P., Frendo, J.L., Evain-Brion, D., and Mallet, F. (2009). Comparative methylation of ERVWE1/syncytin-1 and other human endogenous retrovirus LTRs in placenta tissues. *DNA Res* 16, 195-211.

Gimenez, J., Montgiraud, C., Pichon, J.P., Bonnaud, B., Arsac, M., Ruel, K., Bouton, O., and Mallet, F. (2010). Custom human endogenous retroviruses dedicated microarray identifies self-induced HERV-W family elements reactivated in testicular cancer upon methylation control. *Nucleic Acids Res* 38, 2229-2246.

Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-352.

Hammer, S.M., Squires, K.E., Hughes, M.D., Grimes, J.M., Demeter, L.M., Currier, J.S., Eron, J.J., Feinberg, J.E., Balfour, H.H., Deyton, L.R., *et al.* (1997). A controlled trial of two nucleoside analogues plus zidovudine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 337, 725-733.

Han, Y., Lin, Y.B., An, W., Xu, J., Yang, H.C., O'Connell, K., Dordai, D., Boeke, J.D., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2008). Orientation-dependent regulation of integrated HIV-1 expression by host gene transcriptional readthrough. *Cell Host Microbe* 4, 134-146.

Heidmann, O., Vernochet, C., Dupressoir, A., and Heidmann, T. (2009). Identification of an endogenous retroviral envelope gene with fusogenic activity and placenta-specific expression in the rabbit: a new "syncytin" in a third order of mammals. *Retrovirology* 6, 107.

Hendrich, B., and Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18, 6538-6547.

Chedin, F., Lieber, M.R., and Hsieh, C.L. (2002). The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16916-16921.

Chen, C.P., Chen, L.F., Yang, S.R., Chen, C.Y., Ko, C.C., Chang, G.D., and Chen, H. (2008). Functional characterization of the human placental fusogenic membrane protein syncytin 2. *Biol Reprod* 79, 815-823.

Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., *et al.* (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85, 1135-1148.

Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A., and Fauci, A.S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13193-13197.

Iguchi-Ariga, S.M., and Schaffner, W. (1989). CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 3, 612-619.

Imai, K., Togami, H., and Okamoto, T. (2010). Involvement of histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. *J Biol Chem* 285, 16538-16545.

Ishida, T., Hamano, A., Koiwa, T., and Watanabe, T. (2006). 5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals. *Retrovirology* 3, 69.

Jia, D., Jurkowska, R.Z., Zhang, X., Jeltsch, A., and Cheng, X. (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* 449, 248-251.

Jordan, A., Bisgrove, D., and Verdin, E. (2003). HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J* 22, 1868-1877.

Jordan, A., Defechereux, P., and Verdin, E. (2001). The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J* 20, 1726-1738.

Karlsson, H., Bachmann, S., Schröder, J., McArthur, J., Torrey, E.F., and Yolken, R.H. (2001). Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4634-4639.

Kato, N., Pfeifer-Ohlsson, S., Kato, M., Larsson, E., Rydnert, J., Ohlsson, R., and Cohen, M. (1987). Tissue-specific expression of human provirus ERV3 mRNA in human placenta: two of the three ERV3 mRNAs contain human cellular sequences. *J Virol* 61, 2182-2191.

Kauder, S.E., Bosque, A., Lindqvist, A., Planelles, V., and Verdin, E. (2009). Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog* 5, e1000495.

Kekuda, R., Prasad, P.D., Fei, Y.J., Torres-Zamorano, V., Sinha, S., Yang-Feng, T.L., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1996). Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line. *J Biol Chem* 271, 18657-18661.

Kinoshita, S., Chen, B.K., Kaneshima, H., and Nolan, G.P. (1998). Host control of HIV-1 parasitism in T cells by the nuclear factor of activated T cells. *Cell* 95, 595-604.

Korin, Y.D., and Zack, J.A. (1998). Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J Virol* 72, 3161-3168.

Korin, Y.D., and Zack, J.A. (1999). Nonproductive human immunodeficiency virus type 1 infection in nucleoside-treated G0 lymphocytes. *J Virol* 73, 6526-6532.

Kudo, Y., Boyd, C.A., Sargent, I.L., and Redman, C.W. (2003). Hypoxia alters expression and function of syncytin and its receptor during trophoblast cell fusion of

human placental BeWo cells: implications for impaired trophoblast syncytialisation in pre-eclampsia. *Biochim Biophys Acta* 1638, 63-71.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U., and Bestor, T.H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71, 865-873.

Levin, A., Hayouka, Z., Friedler, A., and Loyter, A. (2010). Specific eradication of HIV-1 from infected cultured cells. *AIDS Res Ther* 7, 31.

Malassine, A., Blaise, S., Handschuh, K., Lalucque, H., Dupressoir, A., Evain-Brion, D., and Heidmann, T. (2007). Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells. *Placenta* 28, 185-191.

Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C.C., Dia, M.C., and Gueye, E.H. (1994). Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265, 1587-1590.

Matouskova, M., Blazkova, J., Pajer, P., Pavlicek, A., and Hejnar, J. (2006). CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues. *Exp Cell Res* 312, 1011-1020.

McCarrey, J.R., Geyer, C.B., and Yoshioka, H. (2005). Epigenetic regulation of testis-specific gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 1061, 226-242.

Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G.M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.Y., Edouard, P., Howes, S., *et al.* (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403, 785-789.

Nabel, G., and Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* 326, 711-713.

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.

Nan, X., Tate, P., Li, E., and Bird, A. (1996). DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol* 16, 414-421.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.

Palella, F.J., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J., and Holmberg, S.D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338, 853-860.

Perron, H., Garson, J.A., Bedin, F., Beseme, F., Paranhos-Baccala, G., Komurian-Pradel, F., Mallet, F., Tuke, P.W., Voisset, C., Blond, J.L., *et al.* (1997). Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7583-7588.

Pion, M., Jordan, A., Biancotto, A., Dequiedt, F., Gondois-Rey, F., Rondeau, S., Vigne, R., Hejnar, J., Verdin, E., and Hirsch, I. (2003). Transcriptional suppression of in vitro-integrated human immunodeficiency virus type 1 does not correlate with proviral DNA methylation. *J Virol* 77, 4025-4032.

Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jäger, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A., and Prokhortchouk, E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* 15, 1613-1618.

Prudhomme, S., Oriol, G., and Mallet, F. (2004). A retroviral promoter and a cellular enhancer define a bipartite element which controls env ERVWE1 placental expression. *J Virol* 78, 12157-12168.

Reuse, S., Calao, M., Kabeya, K., Guiguen, A., Gatot, J.S., Quivy, V., Vanhulle, C., Lamine, A., Vaira, D., Demonte, D., *et al.* (2009). Synergistic activation of HIV-1 expression by deacetylase inhibitors and prostratin: implications for treatment of latent infection. *PLoS One* 4, e6093.

Strick, R., Ackermann, S., Langbein, M., Swiatek, J., Schubert, S.W., Hashemolhosseini, S., Koscheck, T., Fasching, P.A., Schild, R.L., Beckmann, M.W., *et al.* (2007). Proliferation and cell-cell fusion of endometrial carcinoma are induced by the human endogenous retroviral Syncytin-1 and regulated by TGF-beta. *J Mol Med (Berl)* 85, 23-38.

Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., and Tajima, S. (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* 279, 27816-27823.

Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T., and Shinkai, Y. (2001). Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem* 276, 25309-25317.

Taylor, C.S., Nouri, A., Zhao, Y., Takeuchi, Y., and Kabat, D. (1999). A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses. *J Virol* 73, 4470-4474.

Trejbalova, K., Blazkova, J., Matouskova, M., Kucerova, D., Pecnova, L., Vernerova, Z., Heracek, J., Hirsch, I., and Hejnar, J. (2011). Epigenetic regulation of transcription and splicing of syncytins, fusogenic glycoproteins of retroviral origin. *Nucleic Acids Res* 39, 8728-8739.

Van Lint, C., Emiliani, S., Ott, M., and Verdin, E. (1996). Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J* 15, 1112-1120.

Vargas, A., Moreau, J., Landry, S., LeBellego, F., Toufaily, C., Rassart, E., Lafond, J., and Barbeau, B. (2009). Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *J Mol Biol* 392, 301-318.

Vargas, A., Toufaily, C., LeBellego, F., Rassart, A., Lafond, J., and Barbeau, B. (2011). Reduced expression of both syncytin 1 and syncytin 2 correlates with severity of preeclampsia. *Reprod Sci* 18, 1085-1091.

Williams, S.A., Chen, L.F., Kwon, H., Ruiz-Jarabo, C.M., Verdin, E., and Greene, W.C. (2006). NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J* 25, 139-149.

Wong, J.K., Hezareh, M., Gunthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A., and Richman, D.D. (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278, 1291-1295.

Yu, C., Shen, K., Lin, M., Chen, P., Lin, C., Chang, G.D., and Chen, H. (2002). GCMA regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *J Biol Chem* 277, 50062-50068.

Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13, 1924-1935.

Zuo, X., Sheng, J., Lau, H.T., McDonald, C.M., Andrade, M., Cullen, D.E., Bell, F.T., Iacovino, M., Kyba, M., Xu, G., *et al.* (2012). Zinc finger protein ZFP57 requires its co-factor to recruit DNA methyltransferases and maintains DNA methylation imprint in embryonic stem cells via its transcriptional repression domain. *J Biol Chem* 287, 2107-2118.